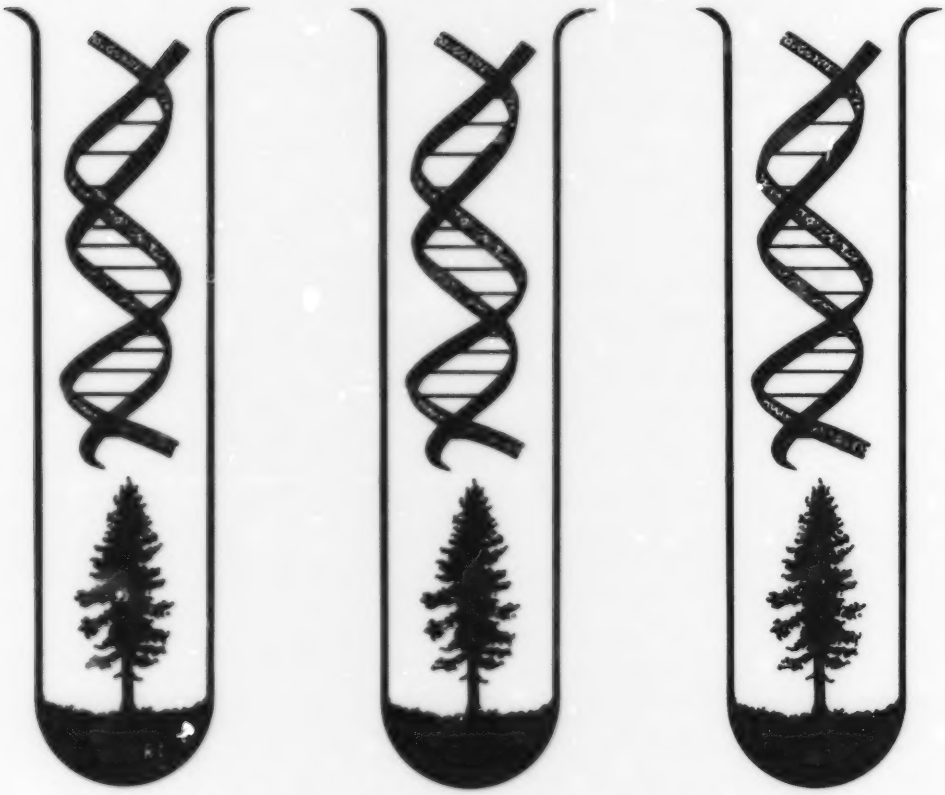
Forêts Canada Forestry Canada

Création d'une banque génomique pour les conifères : un guide de base

L.L. DeVerno, J.R. Byrne, J.A. Pitel et W.M. Cheliak

Rapport d'information PI-X-88F
Institut forestier national de Petawawa



INSTITUT FORESTIER NATIONAL DE PETAWAWA

Le mandat de l'Institut forestier national de Petawawa (IFNP), comme celui des autres établissements de Forêts Canada, est de promouvoir une meilleure gestion et une utilisation plus rationnelle des ressources forestières du Canada, pour le bien économique et social de tous les Canadiens. Les objectifs des programmes menés à l'Institut appuient ce mandat à travers la découverte, le développement, la démonstration, l'application et le transfert des innovations. En tant qu'institut national, il doit s'attacher à des problèmes qui débordent le cadre régional ou qui nécessitent des compétences particulières de même qu'un équipement non disponible aux installations régionales de Forêts Canada. La plupart du temps, les recherches sont effectuées en étroite collaboration avec le personnel des centres régionaux, des services forestiers des provinces et de l'industrie forestière.

Les travaux de recherche et les services techniques de l'Institut sont regroupés autour de cinq principales activités:

GÉNÉTIQUE FORESTIÈRE ET BIOTECHNOLOGIE — Ce programme encadre des études sur la génétique forestière, la microbiologie, la micropropagation, la génétique moléculaire et la recherche sur les semences. Il comprend également les services à la clientèle et la banque de semences du Centre national de semences forestières. Lié à plusieurs organismes internationaux, ce centre existe depuis longtemps.

SYSTÈMES D'AMÉNAGEMENT FORESTIER — Ce programme intègre en recherche et développement des opérations concernant les incendies de forêt, la télédétection, la météorologie, la modélisation, la croissance, la récolte et le relevé des insectes et des maladies des arbres (RIMA). Il permet ainsi l'élaboration et la démonstration de systèmes d'aménagement forestier.

STATISTIQUES NATIONALES SUR LES RESSOURCES FORESTIÈRES — Ce programme fournit les renseignements biologiques, techniques et socio-économiques sur les ressources forestières du Canada. Il vise le développement des bases de données et l'établissement de nouveaux logiciels et bases de données pour aider à l'élaboration des politiques forestières. Le Programme d'inventaire forestier recueille l'information sur les forêts au niveau national, maintient le Système sur les ressources forestières canadiennes et prépare l'inventaire des forêts du Canada.

COMMUNICATIONS — Ce programme regroupe les services offerts par la bibliothèque, les travaux touchant la sensibilisation du public, les renseignements, la rédaction-révision et les publications. L'Institut reçoit plus de 20 000 visiteurs chaque année. Le Centre d'accueil, des visites autoguidées et un programme éducatif complet sont ouverts à tous. C'est à l'IFNP que l'on trouve l'entrepôt et le centre de distribution national de toutes les publications scientifiques de Forêts Canada.

LA FORÊT EXPÉRIMENTALE — Outre des peuplements naturels où l'on applique divers traitements dans le cadre des plans de recherche en sylviculture, la Forêt de Petawawa, mesurant 100 km^2, comprend de vastes superficies de plantations âgées de plus de 60 ans. Les plantations expérimentales livrent des données sur la croissance et la récolte à la suite des expériences de culture. Elles fournissent aussi du matériel génétique dont le lignage est répertorié et qui se révèlent de plus en plus utiles pour les études sur la micropropagation et la génétique moléculaire. C'est un lieu par excellence pour mettre à l'essai des stratégies d'aménagement forestier à court et à long termes.

90-06800/

CRÉATION D'UNE BANQUE GÉNOMIQUE POUR LES CONIFÈRES : UN GUIDE DE BASE

L.L. DeVerno, J.R. Byrne, J.A. Pitel et W.M. Cheliak

Rapport d'information PI-X-88F
Institut forestier national de Petawawa
Forêts Canada
1990

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada, 1989
N° de catalogue Fo46-11/88-1989F
ISBN 0-662-95823-3
ISSN 0228-0736
Imprimé au Canada

Il est possible d'obtenir sans frais des exemplaires de cette publication auprès de :

Forêts Canada
Centre d'information technique et de distribution
Institut forestier national de Petawawa
Chalk River (Ontario)
K0J 1J0

Téléphone : 613-589-2880

Des copies ou des microfiches de cette publication sont en vente à l'adresse suivante :

Micromédia Ltée
Place du Portage
165, rue Hôtel-de-Ville
Hull (Québec)
J8X 3X2

This publication is also available in English under the title
Constructing conifer genomic libraries: a basic guide

Table des matières

v Résumé/Abstract

1 1. Introduction

4 2. Isolement d'ADN de conifère de poids moléculaire élevé

4 2.1 Isolement d'ADN à l'aide de la méthode CTAB modifiée
5 2.1.1 Précautions
5 2.1.2 Dépannage
6 2.2 Isolement d'ADN génomique à partir de tissus en culture

7 3. Fractionnement de l'ADN donneur

7 3.1 Préparation de fragments d'ADN eucaryote de 20 kb
7 3.1.1 Fractionnement de l'ADN donneur
8 3.1.2 Dépannage

9 4. Préparation du vecteur

9 4.1 Purification du phage intact
11 4.2 Extraction et purification de l'ADN phagique
11 4.3 Fractionnement de l'ADN vecteur et purification des bras du phage
11 4.3.1 Coupure de l'ADN vecteur
11 4.3.2 Traitement de l'ADN vecteur fractionné à la phosphatase alcaline
12 4.3.3 Dépannage

13 5. Importance de la souche de cellule hôte dans le clonage d'un ADN génomique végétal

14 6. Ligation, encapsidation et titrage

14 6.1.1 Détermination des conditions optimales de ligation
15 6.1.2 Dépannage
16 6.2 Mise à l'échelle de la ligation et de l'encapsidation

17 7. Amplification et conservation

17 8. Évaluation de la qualité d'une banque d'ADN génomique

17 9. Conclusion

18 Références

18 Remerciements

19 Annexe I: Méthodes de purification de l'ADN
21 Annexe II: Composition des milieux de culture et des tampons
24 Annexe III: Tableau 1: Nombre de recombinants requis pour représenter le génome de diverses espèces
24 Annexe IV: Tableau 2: Concentration de 5-méthylcytosine dans l'ADN végétal

Figures

2 1. Création d'une banque renfermant des fragments d'ADN de diverses tailles obtenus à partir de tissus de conifères

10 2. Carte simplifiée du vecteur EMBL3

RÉSUMÉ

Ce rapport décrit la manière de créer une banque de bactériophages à ADN génomique à partir de tissus de conifères, en l'occurrence des épinettes noires (*Picea mariana* [Mill.] B.S.P.). La méthode peut être appliquée à toutes les espèces végétales. On présente notamment des techniques pour isoler des fragments d'ADN génomique à poids moléculaire élevé à partir d'aiguilles mûres, de semis et de cultures contenant des cellules en suspension. Les auteurs décrivent également la purification de fragments d'ADN génomique fractionnés en fonction de la taille, l'isolation de l'ADN vecteur et la préparation des bras de vecteur. Y sont également détaillés la production de clones recombinants, l'emballage *in vitro*, l'amplification et l'évaluation de la qualité de la banque. Les annexes contiennent des méthodes de purification des fragments, des milieux et des préparations de tampons. Elles font aussi état du nombre de recombinants nécessaires pour représenter les génomes de diverses espèces.

ABSTRACT

Procedures are given for constructing genomic DNA bacteriophage libraries from conifer tissue. Although black spruce *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. tissue was used, the protocols can be applied to any plant species. Included are techniques for high molecular weight genomic DNA isolation from mature needles, seedlings, and cell suspension cultures. In addition, purification of size-fractionated genomic DNA fragments, vector DNA isolation, and preparation of vector arms are outlined. Details are provided for production of recombinant clones, in vitro packaging, amplification, and evaluation of library quality. Appendices contain methods for purification of sized fragments, media and buffer formulas, and the number of recombinants required to represent genomes of various species.

CRÉATION D'UNE BANQUE GÉNOMIQUE POUR LES CONIFÈRES : UN GUIDE DE BASE

1. INTRODUCTION

La biotechnologie offre une technologie innovatrice qui complète les techniques en usage dans les programmes classiques d'amélioration des arbres. Toutefois, l'application de cette technologie nécessite une base solide en recherche fondamentale. Les recherches biotechnologiques sur les arbres forestiers sont concentrées actuellement dans les trois principaux secteurs suivants:

1. La transformation génétique – De nombreuses techniques différentes peuvent servir à introduire des gènes choisis dans des cellules hôtes, par exemple la microinjection, l'utilisation de microprojectiles, l'électroporation et la poration chimique, de même que l'utilisation de la bactérie responsable de l'apparition du cancer végétal, *Agrobacterium tumefaciens*.
2. La culture de cellules et de tissus végétaux – Il s'agit d'une méthode qui sert à la fois à produire, à maintenir et à multiplier des plantules viables renfermant des gènes ou des combinaisons de gènes choisis obtenus par transformation ou par des méthodes de sélection classiques.
3. La biologie moléculaire – Des techniques faisant appel à la biologie moléculaire servent à identifier et à caractériser les gènes. Il faut comprendre les facteurs qui règlent l'expression de ces gènes pour que le transfert de gènes ou de combinaisons de gènes spécifiques puissent donner des phénotypes prévisibles.

On peut créer deux types de banques d'ADN pour faciliter l'identification et l'isolement des gènes, les banques d'ADNc et les banques génomiques. Idéalement, une banque d'ADNc (ADN complémentaire) renferme des séquences correspondant à toutes les séquences d'ARNm transcrites dans une cellule. Par conséquent, une banque d'ADNc facilite l'étude de la structure, de l'organisation et de l'expression des gènes qui sont biologiquement actifs dans un tissu ou au cours de la phase de développement correspondant au moment où l'ARNm a été isolé. En revanche, une banque d'ADN génomique est une collection de fragments clonés au hasard qui, dans l'ensemble, renferme théoriquement toutes les séquences d'un génome donné. Les fragments clonés sont de tailles assez importantes pour renfermer des gènes complets, des gènes liés, ainsi que leurs régions flanquantes sous une forme stable.

L'obtention d'une banque d'ADN génomique comporte la coupure de l'ADN génomique à l'aide d'un enzyme de restriction pour produire des fragments de tailles connues qui peuvent ensuite être clonés dans un vecteur approprié. La fraction d'ADN qui peut être incorporée dans la banque de gènes (la fraction clonable) est cette partie des fragments comprise entre la taille minimale et maximale de l'insert que permet le vecteur choisi. Toutefois, cela suppose que chaque liaison internucléotidique a la même probabilité d'être un site de coupure de l'enzyme de restriction et que la vitesse de coupure ne varie pas d'un site à l'autre sur l'ADN à cloner. Si chaque fragment d'ADN clonable est de taille identique et que la taille du génome est connue, on peut représenter la taille de la banque qui aura théoriquement toute probabilité de comprendre une séquence d'ADN particulière par la formule suivante (Clarke et Carbon, 1976) :

$$N=\ln(1-p)/\ln(1-f),$$

où p est la probabilité qu'une séquence particulière d'ADN soit représentée, f est la fraction du génome représenté par chaque fragment et N correspond au nombre de fragments clonés et, par conséquent, au nombre de clones recombinants requis. L'Annexe III présente, pour diverses espèces, le nombre de recombinants requis pour obtenir une probabilité de 99% (p=0,99) qu'une séquence d'ADN donnée soit représentée dans une banque de fragments de 17 kb.

Certaines séquences génomiques peuvent être absentes dans une banque théoriquement complète (c'est-à-dire une banque renfermant le nombre adéquat de recombinants correspondant à un p de 0,99) et d'autres séquences peuvent être sous-représentées. La répartition des sites de coupure a un effet sur les séquences qui sont représentées. En outre, certaines régions du chromosome eucaryote peuvent renfermer des séquences d'ADN empêchant la croissance du bactériophage lambda et qui peuvent être éliminées de la banque. Des recombinaisons se produisant au cours de la propagation du phage peuvent se traduire par des délétions inopportunes ou par une modification des séquences clonées.

La Figure 1 présente les étapes de base de la création d'une banque d'ADN génomique, que l'on peut résumer ainsi :

(1) isolement et purification de l'ADN eucaryote;
(2) coupure de l'ADN en fragments de taille appropriée aptes à être clonés;
(3) préparation d'un ADN vecteur;
(4) ligation du fragment de l'ADN eucaryote avec l'ADN vecteur;
(5) encapsidation des molécules recombinantes, titrage;
(6) amplification et conservation des clones;
(7) analyse.

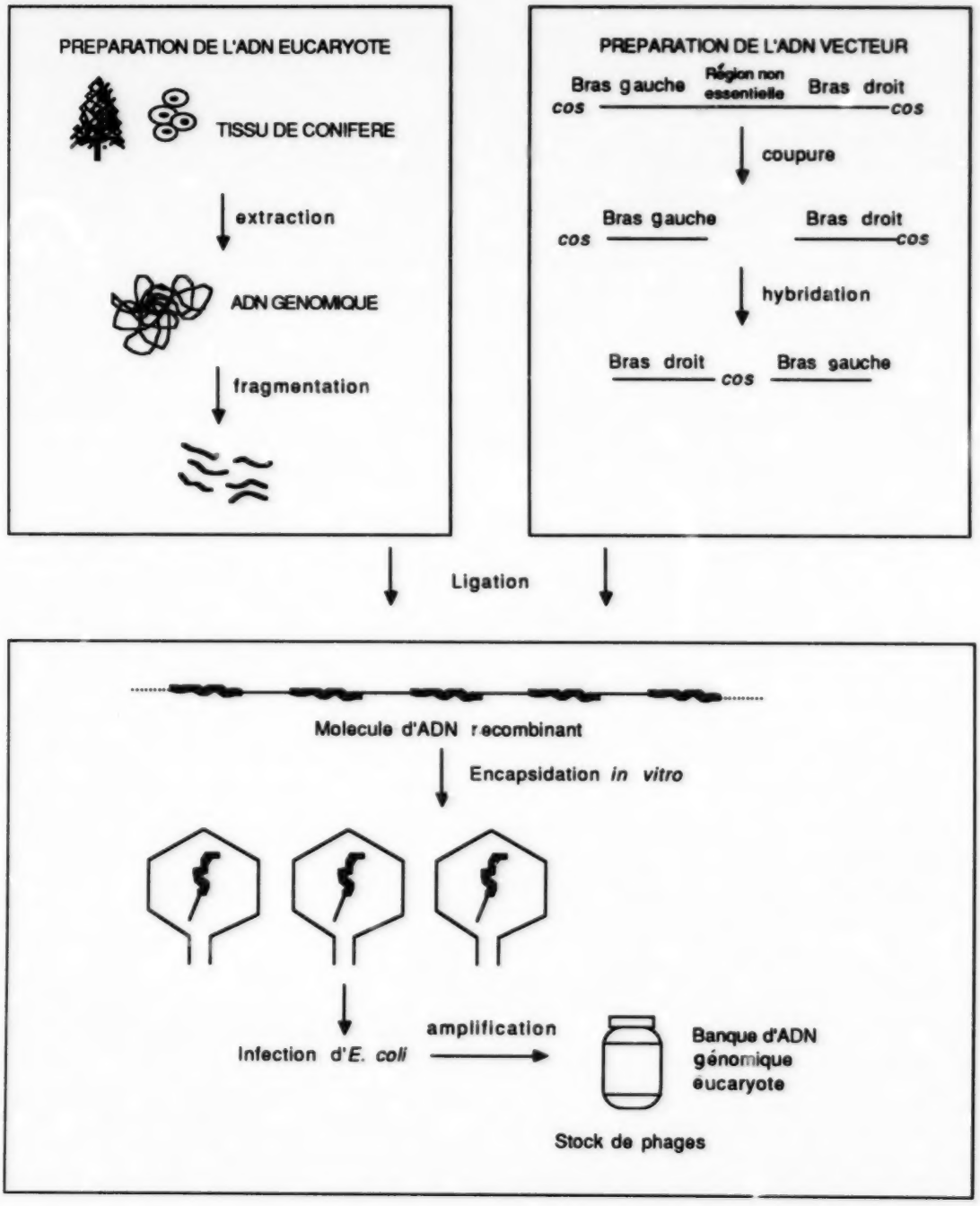


Figure 1. Création d'une banque renfermant des fragments d'ADN de diverses tailles obtenus à partir de tissus de conifères.

Le présent rapport a pour but de décrire, de façon structurée, la production des banques d'ADN génomique de conifères à l'aide d'un bactériophage. Nous présentons les techniques utilisées et les problèmes qui peuvent se présenter dans la création d'une banque génomique représentative pour l'épinette noire chez le bactériophage EMBL3 utilisé comme vecteur. On peut également consulter les guides de clonage moléculaire suivants qui donnent une description plus détaillée de certaines techniques de clonages :

(1) Maniatis et collab., 1982, Molecular Cloning: a laboratory manual;
(2) Davis et collab., 1980, Advanced bacterial genetics;
(3) Methods in Molecular Biology, Volume 2, 1984;
(4) Methods in Enzymology, Volume 152, 1987.

2. ISOLEMENT D'ADN DE CONIFÈRE DE POIDS MOLÉCULAIRE ÉLEVÉ

Il est beaucoup plus difficile d'isoler de l'ADN de poids moléculaire élevé de tissus végétaux que de tissus animaux à cause notamment de la présence d'une paroi cellulaire rigide et de la forte teneur en polysaccharides chez les végétaux (Miksche et Dhillon, 1981). L'acide nucléique isolé de tissus végétaux doit, pour servir à la création d'une banque, répondre à trois critères importants. Premièrement, l'ADN doit être suffisamment pur pour être coupé par les endonucléases de restriction. Deuxièmement, la production d'acide nucléique doit être suffisante de façon à ce que le tissu disponible donne une banque complète. Troisièmement, l'ADN doit être de poids moléculaire élevé (fragments d'au moins 100 kb) de façon à ce que la coupure par l'endonucléase de restriction donne suffisamment de fragments de la taille voulue et présentant des extrémités cohésives.

On a utilisé avec succès la méthode CTAB modifiée (Murray et Thompson, 1980) pour isoler de l'ADN pur de poids moléculaire élevé à partir d'aiguilles mûres et de tissus de semis d'épinette blanche *Picea glauca*, d'épinette noire *Picea mariana* et de pin gris *Pinus banksiana*.

2.1 Isolement d'ADN à l'aide de la méthode CTAB modifiée

i) Couper 15-150 g d'aiguilles fraîches. Laver les aiguilles dans un détergent, puis stériliser en surface dans une solution d'hypochlorite à 2% pendant 20 minutes. Rincer trois fois avec de l'eau distillée stérile.

ii) Congeler les aiguilles dans l'azote liquide et réduire en poudre fine dans un grand mortier (abaisser lentement la température du mortier avant d'ajouter l'azote liquide pour empêcher celui-ci de se briser). Ajouter environ 10 g de tissu dans le mortier, ainsi que 10-20 ml d'azote liquide. Dès que le tissu est congelé, broyer pendant une minute jusqu'à l'obtention d'une poudre. Des fragments d'aiguilles seront encore présents; il faut donc ajouter une autre portion de 10 mL d'azote liquide à la poudre et broyer de nouveau jusqu'à la disparition des fragments. La poudre doit être exempte de fragments d'aiguilles et plus fine que du sel de table.

iii) Ajouter la poudre à 100-200 mL de tampon d'extraction CTAB froid dans un vase à bec. Mélanger doucement.

iv) Répéter les étapes (ii) et (iii) jusqu'à ce que les aiguilles soient broyées. On ajoute chaque lot de poudre au même vase à bec contenant le tampon d'extraction CTAB de telle sorte que le volume final de tampon et de poudre soit d'environ 300 mL.

v) Filtrer la solution à travers plusieurs épaisseurs d'étamine et une épaisseur de "miracloth". La réextraction du broyat de tissu augmente le rendement en ADN.

vi) Centrifuger les organelles à 9 000 tr/min pendant 15 minutes à 4°C. Jeter la phase aqueuse.

vii) Remettre le culot de centrifugation en suspension dans un petit volume (5-50 mL) de tampon de lavage CTAB. Le laisser parvenir à la température ambiante (22-25°C).

viii) Ajouter 1/5 de volume de sarcosyl 5%; conserver 10 minutes à la température ambiante. La solution devrait prendre un aspect visqueux. Ajouter alors 1/7 de volume de NaCl 5 M et mélanger en retournant doucement les tubes plusieurs fois. Ajouter 1/10 de volume de CTAB 8,6% dans NaCl 0,7 M. Mélanger doucement.

ix) Incuber à 60°C pendant 15 minutes.

x) Ajouter un volume égal de chloroforme-alcool isoamylique (24:1) et mélanger le tube en le retournant jusqu'à la formation d'une émulsion.

xi) Centrifuger à 5 000 tr/min pendant 10 minutes; enlever la phase aqueuse supérieure et la mettre dans un tube propre.

xii) Ajouter 2-3 volumes d'éthanol absolu froid et mélanger rapidement en retournant pour précipiter l'ADN. Soutirer l'ADN à l'aide d'une pipette Pasteur recourbée et dissoudre dans un petit volume de tampon TE. Laisser l'ADN se dissoudre à la température de la pièce.

xiii) Ajouter 0,96 g/mL de CsCl et dissoudre doucement. Ajouter du bromure d'éthidium pour obtenir une concentration de 300 µg/mL. Remplir et boucher un tube à ultracentrifugation de la taille appropriée. Centrifuger à 40 000 tr/min pendant au moins 16 heures à 15°C dans une ultracentrifugeuse.

xiv) Recueillir l'ADN en perforant le tube à 2 mm sous la bande à l'aide d'une aiguille de calibre 18 et soutirer la bande d'ADN dans un tube stérile.

xv) Ajouter de l'alcool isoamylique saturé de sel ou de l'isobutanol saturé d'eau et extraire la bande d'ADN recueillie jusqu'à la disparition du bromure d'éthidium dans la phase aqueuse inférieure renfermant l'ADN. Extraire à trois autres reprises.

xvi) Dialyser contre 4 L de tampon TE à 4°C en changeant le tampon à au moins trois reprises. Au besoin, concentrer l'échantillon d'ADN en extrayant doucement plusieurs fois à l'aide d'un volume égal d'isobutanol. Redialyser ou précipiter l'ADN en ajoutant 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et 2-3 volumes d'éthanol absolu sur glace. Centrifuger à 12 000 tr/min pour sédimenter l'ADN, jeter la phase aqueuse et laver le culot avec de l'éthanol à 70% froid. Centrifuger, jeter la phase aqueuse, déshydrater le culot dans un dessiccateur sous vide et le remettre en suspension dans un tampon TE.

xvii) Déterminer la concentration d'ADN en mesurant la densité optique à 260 nm ou en séparant par électrophorèse sur gel en présence d'étalons d'ADN. Chez l'épinette noire, on obtient un rendement d'environ 900 µg/100 g d'aiguilles et chez le pin gris, le rendement est d'environ 250 µg/100 g d'aiguilles.

xviii) Analyser l'ADN par électrophorèse à la température ambiante sur un gel d'agarose NA (Pharmacia) 0,4% en présence d'ADN lambda intact comme marqueur de taille. L'ADN de poids molé-

culaire élevé forme une bande étroite derrière l'ADN lambda.

2.1.1 *Précautions*

1) Les tissus doivent être congelés le plus rapidement possible et décongelés uniquement en présence d'agents inactivant la nucléase, tels un détergent, de l'EDTA ou du phénol.
2) On doit éviter de congeler plusieurs fois de l'ADN de poids moléculaire élevé. Des solutions stériles d'ADN ne renfermant aucun enzyme actif se conservent longtemps à 4°C dans un tampon TE (Kaiser et Murray, 1985).
3) Il faut réduire au minum l'endommagement de l'ADN par cisaillement mécanique. Les fragments endommagés ont des effets inhibiteurs à différents stades de la procédure de clonage; ils se lient de façon non productive à des fragments d'ADN du vecteur, entravent la ligation et inhibent les réactions d'encapsidation. Il faut utiliser des pipettes à large embouchure avec des solutions d'ADN de poids moléculaire élevé.
4) L'ADN végétal isolé par cette méthode présente un ratio d'absorption dans l'UV à 260/280 nm d'environ 1,8-1,9 et à 260/230 nm, d'environ 2,0-2,4. Les acides nucléiques peuvent être contaminés par des protéines ou des polysaccharides lorsque le matériel de départ renferme des teneurs élevées de ces substances. Ces contaminants peuvent créer des problèmes au moment de la remise en suspension de l'ADN précipité par l'éthanol ou lors de la digestion de l'ADN par les endonucléases de restriction.

2.1.2 *Dépannage*

Problème	Causes possibles	Solution
faible rendement en ADN	a) organelles cellulaires non libérées	a) broyer le tissu plus finement
	b) activité nucléasique	b) i) garder le tissu congelé pendant l'extraction et transférer immédiatement la poudre dans un tampon d'extraction froid ii) stériliser le tissu avant de le broyer iii) stériliser toutes les solutions
	c) âge/type du tissu	c) les meilleurs rendements s'obtiennent à partir de suspensions cellulaires, de semis et d'aiguilles d'un an, provenant d'arbres mûrs
l'ADN ne se dissout pas	a) teneur en protéines trop élevée	a) i) extraire à nouveau avec du chloroforme-alcool isoamylique (24:1) ii) augmenter le volume de tampon de lavage CTAB iii) purifier à nouveau l'ADN sur gradient de CsCl
	b) concentration d'ADN trop élevée	b) ajouter davantage de tampon TE
	c) la solution doit être chauffée ou l'ADN prend du temps à se dissoudre	c) i) chauffer la solution au plus 10 minutes à 65°C ii) incuber la solution à 4°C et laisser dissoudre pendant 1-2 jours
Dégradation de l'ADN	a) traces d'exonucléase ou contamination bactérienne	a) traiter l'ADN avec du SDS 0,1% et 1/100 de volume de protéase K (3 mg/mL) à 37°C pendant 30 minutes. Extraire ensuite au phénol/chloroforme et précipiter à l'éthanol
	b) endommagement par cisaillement mécanique au cours de l'isolement	b) i) éviter les cycles de gel-dégel ii) utiliser des embouts de pipette de gros calibre iii) traiter l'ADN avec précaution lors de la remise en suspension

Note : La méthode CTAB modifiée peut être utilisée pour isoler de l'ADN de tissus de semis. Il faut moins de matériel de départ pour obtenir un rendement en ADN équivalent à celui qui peut être obtenu à partir d'aiguilles mûrs.

2.2 Isolement d'ADN génomique à partir de tissus en culture

Les cultures de tissus végétaux représentent une excellente source d'ADN pour le clonage, car l'extraction est relativement facile (comparativement aux aiguilles mûres qui doivent être broyées) et parce que le matériel de départ donne un meilleur rendement d'ADN par gramme. Le tissu étant stérile, il n'y a pas d'enzymes fongiques ou bactériens, et les cellules éclatent facilement sans qu'il soit nécessaire de les soumettre à des extractions préliminaires poussées. En utilisant des cultures de tissu, on peut obtenir un rendement jusqu'à dix fois supérieur à celui qu'on obtient avec des tissus mûres, des aiguilles de conifères par exemple (nos résultats publiés en témoignent : 900 µg d'ADN/100 g d'aiguilles contre 1,4 mg d'ADN/10 g de tissus cultivés). Dans notre laboratoire, nous avons adapté avec succès la méthode de Mettler (1987) à l'isolement de l'ADN de cellules embryogéniques et de cals non embryogéniques de diverses essences de conifères.

Isolements de l'ADN de tissus en culture

i) Peser le tissu, habituellement 10 g, et transférer dans un mortier stérile. Lorsqu'on utilise moins de 100 mg de tissu, transférer plutôt dans un petit broyeur rond en verre de façon à réduire les pertes d'homogénat sur les parois. Ajouter deux volumes de tampon d'homogénéisation de Mettler et homogénéiser en prenant garde de ne pas trop faire mousser. Transférer l'homogénat dans un tube à centrifuger et rincer le récipient d'homogénéisation avec 1 à 2 volumes de tampon d'homogénéisation de Mettler.

ii) Incuber l'homogénat dans des conditions stériles à la température ambiante pendant une période supplémentaire de 20 à 30 minutes, en broyant de temps en temps pour briser les cellules non rompues. Ajouter un égal volume de phénol (équilibré avec du NaCl 0,5 M et du Tris-HCl 100 mM à pH 8,0); mélanger jusqu'à la formation d'une émulsion et centrifuger pour séparer les phases. Enlever soigneusement la phase aqueuse (supérieure), ajouter le mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) et mélanger jusqu'à la formation d'une émulsion. Centrifuger pour séparer les phases.

iii) Prélever la phase aqueuse (supérieure) et précipiter l'ADN à l'aide de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et de 2 volumes d'éthanol absolu froid. Prélever l'ADN en soutirant le précipité ou en centrifugeant. Remettre l'ADN en suspension dans un tampon TE, puis purifier sur un gradient à l'équilibre de CsCl (se reporter aux étapes xii) à xvii) de la méthode CTAB modifiée, à la rubrique 2.1).

iv) Le rendement est d'environ 1,4 mg d'ADN/10 g de cellules congelées.

3. FRACTIONNEMENT DE L'ADN DONNEUR

Le vecteur de replacement EMBL3 accepte des fragments d'ADN étranger pouvant compter jusqu'à 9-23 kb (Frischauf et collab., 1983). Pour obtenir une population de molécules en moyenne de 20 kb en vue d'un clonage dans ce type de vecteur, on peut préparer de l'ADN eucaryote par fragmentation aléatoire ou digestion par une endonucléase de restriction dans des conditions contrôlées. Seul un mode de fractionnement de l'ADN indépendent de la séquence, comme l'isolement mécanique, peut donner une banque vraiment aléatoire. Toutefois, une telle méthode exige des traitements enzymatiques supplémentaires pour produire des extrémités cohésives compatibles avec les bras du vecteur. Il est plus pratique de fractionner l'ADN par digestion partielle à l'aide d'enzymes de restriction, car cette méthode produit un ensemble de fragments aléatoires chevauchants qui suffisent dans la plupart des cas. Une banque renfermant de tels fragments n'est pas vraiment aléatoire parce que les terminaisons des fragments ne sont pas réparties au hasard parmi les sites de coupure possibles et que ces sites ne sont pas répartis au hasard sur toute la longueur de l'ADN génomique.

Le fractionnement de l'ADN génomique par digestion partielle s'accomplit habituellement au moyen de l'endonucléase de restriction *Mbo*I ou de son isoschizomère *Sau*3A. Ces enzymes produisent des extrémités cohésives compatibles avec les terminaisons des bras du vecteur EMBL3 qui sont obtenues lorsque le fragment central non essentiel est excisé à l'aide de l'enzyme *Bam*HI. On peut utiliser diverses méthodes pour séparer physiquement des autres fragments les fragments d'ADN génomique de la taille souhaitée. L'électrophorèse sur gel avec élution de l'ADN peut convenir, mais l'agarose ou d'autres contaminants peuvent inhibier l'activité de la ligase. L'alternative préférable est l'ultracentrifugation en gradients de sucrose ou de chlorure de sodium.

3.1 Préparation de fragments d'ADN eucaryote de 20 kb

Il faut vérifier que tous les enzymes utilisés présentent bien l'activité recherchée et sont exempts de traces de nucléases qui pourraient inhiber la ligation subséquente des fragments d'ADN. Il ne faut utiliser que les enzymes fournis avec des résultats démontrant les activités d'endonucléase, d'exonucléase et de ligation/recoupure (par exemple ceux qui sont commercialisés par BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg, Md).

3.1.1 Fractionnement de l'ADN donneur

i) Mélanger 10 µg d'ADN génomique avec 10 µL de tampon *Mbo*I *(ou Sau*3A) 10X et ajouter suffisamment de l'eau distillée stérile pour obtenir un volume total de 100 µL.

ii) Ajouter 20 µL dans un microtube à centrifuger (tube 1) et 10 µL dans les tubes 2 à 9. Refroidir les tubes sur glace.

iii) Ajuster la préparation enzymatique commerciale de *Mbo*I (ou de *Sau*3A) à une concentration de 1 unité/µL en utilisant le tampon suggéré par le fabricant. Ajouter 1 µL au tube 1 et mélanger (0,5 unités par µg). Prélever 10 µL et mélanger au contenu du tube 2 (0,25 unités par µg). Poursuivre la dilution en série jusqu'au tube 8, en mélangeant complètement à chaque étape. Le tube 9 est un témoin d'ADN non digéré.

iv) Incuber à 37°C pendant une heure.

v) Arrêter la réaction en plaçant immédiatement les échantillons sur glace et en ajoutant une quantité suffisant d'EDTA de façon à obtenir une concentration finale de 20 mM. Les échantillons sont séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose TAE 0,4% à 2 V par cm. On inclut un échantillon d'ADN de phage lambda traité à *Eco*RI ou *Hind*III comme marqueur de taille. L'utilisation d'une basse tension améliore la résolution de l'ADN de poids moléculaire élevé.

vi) Déterminer la concentration d'enzyme qui produit une fluorescence maximale dans la fourchette de tailles d'ADN de 18 à 23 kb. La moitié de cette concentration d'enzyme produit le nombre maximal de molécules dans la fourchette de tailles voulue.

vii) Augmenter le volume de réaction de façon à digérer la quantité d'ADN nécessaire pour obtenir une banque représentative. Utiliser les mêmes variables que dans la réaction d'essai. Choisir des concentrations d'enzyme égales à la moitié et au double de la concentration optimale pour fractionner l'ADN génomique, de manière à réduire au minimum les fragments renfermant une distribution non aléatoire de sites de coupure.

viii) Arrêter immédiatement la réaction en plaçant les tubes à essai sur glace et en ajoutant de l'EDTA pour obtenir une concentration de 20 mM. Analyser des aliquotes des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose en comparant avec des marqueurs de taille appropriés et de l'ADN non digéré pour vérifier la distribution en fonction de la taille.

ix) Réunir les échantillons et extraire doucement avec le mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1). Ajouter 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et précipiter l'ADN en ajoutant 2 volumes d'éthanol absolu froid. Centrifuger l'ADN, laver le culot à deux reprises avec de l'éthanol à 70% et remettre en suspension dans 200 à 500 µL de tampon TE.

x) Purifier les fragments obtenus afin d'éliminer les composés qui pourraient inhiber les réactions de ligation ou d'encapsidation (voir Annexe I).

3.1.2 Dépannage

Problème	Causes possibles	Solution
pas de coupure dans l'ADN	a) présence d'inhibiteurs ou d'impuretés dans la solution d'ADN	a) i) extraire la solution deux fois avec du phénol et deux fois avec le mélange de chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Précipiter l'ADN avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol. Remettre le précipité en suspension dans un tampon TE et répéter la digestion partielle. ii) purifier à nouveau l'ADN sur gradient de CsCl.
	b) l'ADN n'était pas en suspension uniforme dans la solution lors de l'essai	b) chauffer l'ADN à 65°C pendant 10 minutes. Vérifier que l'ADN est en suspension uniforme en pipettant la solution avec soin.
ADN dégradé	a) traces d'exonucléase ou de bactéries dans la solution d'ADN	a) traiter l'ADN avec du SDS 0,1% et 1 goutte de protéase K (3 mg/mL) à 37°C pendant 30 minutes. Procéder ensuite à une extraction au phénol-chloroforme et à une précipitation à l'éthanol.
	b) trop d'enzyme a été ajouté	b) voir b) ci-dessus.

4. PRÉPARATION DU VECTEUR

Le vecteur de remplacement EMBL3 préparé à partir du bactériophage lambda présente une capacité de clonage de 9-23 kb. Il provient de l'insertion de sites de clonage multiples entre les bras essentiels du phage et les sites multiples de reconnaissance non essentiels dans la partie centrale du phage lambda 1059 (Karn et collab., 1980). Les sites de clonage multiples renferment des séquences de reconnaissance pour les enzymes de restriction *Bam*HI, *Sal*I et *Eco*RI (Figure 2). Les bras gauche et droit du vecteur flanquent ces sites. Les protéines du virion sont codées sur le bras gauche qui mesure 19,3 kb. Le bras droit renferme le code pour l'origine de la réplication, les principaux promoteurs et d'autres gènes essentiels. Les bras sont terminés par des projections monocaténaires de 12 nucléotides complémentaires. Ces sites cohésifs (cos) permettent au génome du phage lambda de se cycliser suite à l'infection; ils sont régénérés lors de l'encapsidation du génome du phage. Entre les deux bras, le fragment central du vecteur EMBL3 est flanqué de polylinkers en orientation inversée, de la façon suivante :

*Sal*I-*Bam*HI-*Eco*Ri--région centrale non essentielle--*Eco*RI-*Bam*HI-*Sal*I

Chacun des trois enzymes (*Sal*I, *Bam*HI ou *Eco*RI) peut être utilisé pour le clonage, mais le vecteur a été conçu (Karn et collab., 1980) spécialement pour être utilisé avec l'enzyme *Bam*HI qui coupe à intervalle au niveau de la séquence hexanucléotidique :

```
    ↓
GGATCC
CCTAGG
      ↑
```

Le centre du site de reconnaissance du *Bam*HI est le site de reconnaissance des enzymes *Mbo*I et *Sau*3A, qui coupent la séquence suivante :

```
↓
GATC
CTAG
   ↑
```

Ainsi, l'ADN du EMBL3 coupé par l'enzyme *Bam*HI peut accepter un fragment d'ADN exogène coupé par digestion partielle au moyen de l'enzyme *Mbo*I ou *Sau*3A.

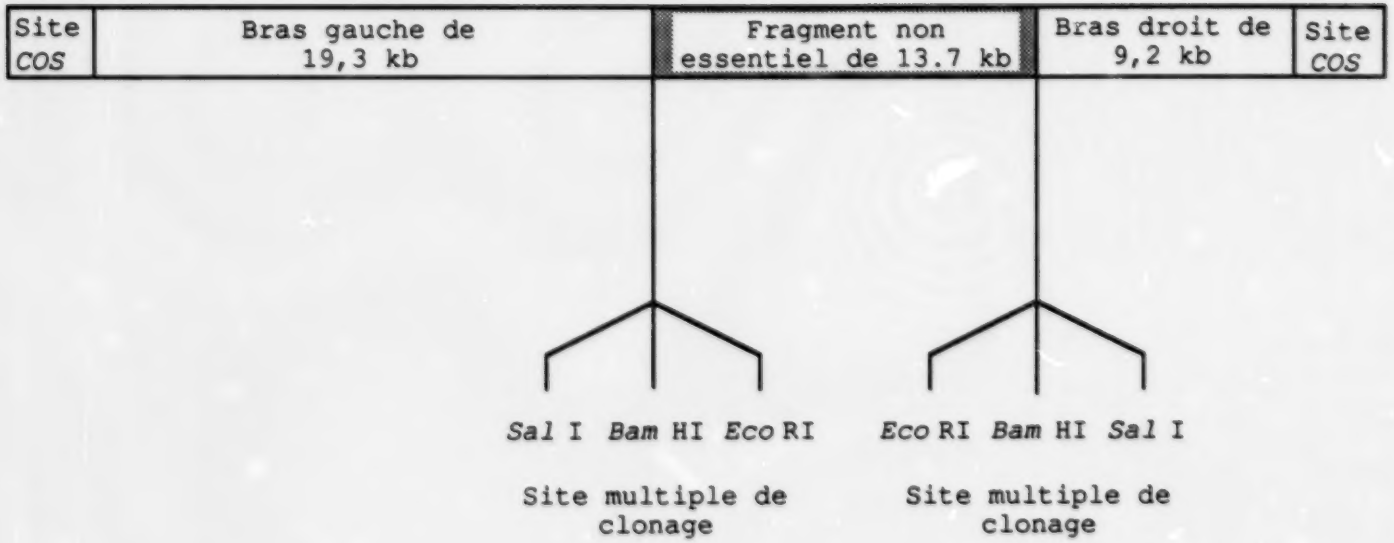
Une banque génomique eucaryote complète est habituellement constituée de millions de particules phagiques infectieuses, dont chacune renferme un fragment unique de l'ADN eucaryote. Seuls les génomes du phage EMBL3 qui font entre 40 et 52 kb se révèlent des particules phagiques infectieuses après l'encapsidation. La ligation des deux bras d'un vecteur de remplacement génère une molécule d'ADN trop petite pour être encapsidée. Par conséquent, en théorie, seules les molécules comportant un fragment d'ADN exogène de 17-23 kb réuni aux bras gauche et droit d'un vecteur (molécule d'ADN recombinant) peuvent être encapsidées et se révéler infectieuses. Il s'agit en fait d'une technique d'enrichissement de molécules recombinantes. En outre, le vecteur EMBL3 possède certain gènes dont le phénotype peut être utilisé pour sélectionner des clones phagiques recombinants. La sélection est basée sur le phénotype Spi^+ (sensible à l'inhibition par P2). La croissance du phage présentant ce phénotype ne s'effectue pas sur les souches bactériennes lysogènes pour le prophage P2. Les gènes responsables de l'inhibition par P2 sont présents dans la région centrale des vecteurs EMBL3. Lorsqu'on enlève ces gènes (*red* et *gam*) et qu'on les remplace par un insert d'ADN, le phage exprime le phénotype Spi^- et peut être étalé sur boîte de Pétri renfermant un hôte à lysogène P2.

4.1 Purification du phage intact

Des cultures sont effectuées sur boîte de Pétri à partir de plages individuelles et titrées par dilution en série. L'isolement de phages sur une grande échelle par double ultracentrifugation sur gradient de CsCl donne les préparations de phage les plus pures. La méthode suivante, adaptée de Davis et collab., 1980, fait appel à cette technique.

Isolement du phage

i) Pour purifier le phage, ensemencer le phage en stries sur une boîte de Pétri LB, comme le décrivent Davis et collab. (1980), en utilisant comme hôte la souche de *E. coli* dépourvue des loci McrA et McrB (voir la rubrique 5).
ii) Prélever des cylindres de plusieurs plages turbides, ensemencer chaque cylindre sur une boîte de Pétri renfermant de la gélose LB fraîche et titrer.
iii) A partir de chaque culture, ensemencer dix autres boîtes de Pétri de 150 mm, tel que décrit par Davis et collab. (1980). Utiliser $2,5 \times 10^6$ unités formant plage (pfu), 125-150 µL de cellules-hôtes et 5 mL de gélose LB molle par boîte de Pétri de 150 mm. Après une incubation de 5-6 heures à 37°C, les boîtes devraient avoir l'air d'un tapis troué. Après une croissance de plus de 5-6 heures, le titre de la culture diminue. Si le phage est mis en culture sur milieu NUNC (boîtes de 530 cm^2), utiliser $7,5 \times 10^6$ pfu/boîte, 1 mL de cellules-hôtes et 35 mL de gélose molle.
iv) Refroidir les boîtes à 4°C au moment où le tapis commence à se former. Lorsque les boîtes sont bien refroidies, recouvrir de 10 mL de diluant lambda froid et de quelques gouttes de chloroforme. Laisser le phage diffuser dans le diluant lambda à 4°C jusqu'au lendemain.
v) Enlever la solution de recouvrement et centrifuger les débris dans une ultracentrifugeuse à 10 000 tr/min à 4°C pendant 15 minutes.
vi) Sédimenter les phages dans une ultracentrifugeuse à 23 000 tr/min à 4°C pendant 90 minutes.
vii) Remettre chaque culot de phages en suspension dans 1 mL de diluant λ et attendre au lendemain.


Site cos
Bras gauche de 19,3 kb
Fragment non essentiel de 13.7 kb
Bras droit de 9,2 kb
Site cos
Sal I Bam HI Eco RI
Site multiple de clonage
Eco RI Bam HI Sal I
Site multiple de clonage

viii) Ajouter 0,75 g de CsCl/mL de suspension de phages. Centrifuger les phages au moins 5 heures à 54 000 tr/min dans une ultracentrifugeuse. Prélever la bande renfermant les phages, redéposer sur un gradient et recentrifuger à 54 000 tr/min. Prélever la bande renfermant les phages. Dialyser la solution de phages contre le tampon TE pour éliminer le CsCl. Les phages se conservent à 4°C.

4.2 Extraction et purification de l'ADN phagique

i) À 500 µL de la suspension de phages, ajouter 10 µL de SDS à 10% et 5 µL de protéase K (3 mg/mL dans un glycérol à 50%). Incuber à 37°C pendant au moins 30 minutes.

ii) Extraire à deux reprises avec le mélange phénol-chloroforme (1:1) et une fois avec le mélange chloroforme-alcool isoamylique (24:1) et précipiter à l'éthanol. Remettre en suspension dans 500 µL de tampon TE. A noter que l'ADN est habituellement concentré et qu'il doit être remis en suspension de façon passive à 4°C pendant 2 à 3 jours pour devenir une suspension homogène.

4.3 Fractionnement de l'ADN vecteur et purification des bras du phage

Chez les vecteurs du bactériophage lambda, tels EMBL3, utilisés dans la création d'une banque, il faut éliminer la région centrale non essentielle de leur génome pour la remplacer par un ADN étranger de 15-20 kb. Chez le vecteur EMBL3, les sites *Bam*HI sont flanqués à l'intérieur par des sites *Eco*RI. La coupure par *Bam*HI et *Eco*RI donne de courts fragments linkers de *Bam*HI-*Eco*RI (<10 paires de bases) à partir des deux extrémités du fragment central. On évite ainsi la compétition entre le fragment central et l'ADN donneur pour les sites de ligation sur les bras du vecteur. Dans le cas de l'ADN du vecteur EMBL3, il faut en règle générale digérer d'abord avec *Bam*HI jusqu'à la coupure complète, puis après avoir ajusté les conditions du tampon pour *Eco*RI, digérer avec une quantité préétablie d'*Eco*RI.

4.3.1 Coupure de l'ADN vecteur

i) Déterminer les conditions nécessaires pour une digestion complète de l'ADN vecteur avec *Bam*HI et *Eco*RI dans des essais pilotes séparés. Vérifier que la coupure est complète par électrophorèse en gel d'agarose.

ii) Digérer 20-50 µg d'ADN vecteur en ajoutant la quantité préétablie de *Bam*HI et vérifier que la réaction est complète en soumettant un petit échantillon (0,2 µg ou moins) à l'électrophorèse.

iii) Lorsque la digestion *Bam*HI est complète, ajuster le tampon de réaction pour les conditions d'*Eco*RI et digérer en ajoutant la quantité préétablie d'*Eco*RI.

iv) Extraire doucement une fois avec un volume égal de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) et une fois avec du chloroforme. Ajouter 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et précipiter l'ADN au moyen d'isopropanol de façon à laisser le linker de 10 pb en solution.

v) Centrifuger, laver le culot deux fois avec 1/2 volume d'isopropanol à 40% additionné de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M, sécher brièvement dans un dessiccateur sous vide et remettre le culot en suspension dans un tampon TE de façon à obtenir une concentration approximative de 250-500 µg/mL. Déterminer la concentration exacte d'ADN et purifier sur colonne NACS au besion (voir Annexe I).

4.3.2 Traitement de l'ADN vecteur fractionné à la phosphatase alcaline (facultatif) (Maniatis et collab., 1982)

La phosphatase alcaline d'intestin de veau hydrolyse les résidus 5'-phosphates de l'ADN et de l'ARN. L'enlèvement des résidus 5'-phosphates des fragments du vecteur empêche les fragments non essentiels enlevés et les linkers de se rattacher aux bras du vecteur.

i) A 45 µL du vecteur fractionné dans un tampon TE, ajouter 5 µL de tampon CIP 10X et 1 µL de CIP (phosphatase alcaline d'intestin de veau; 2,2 unités/µL).

ii) Incuber à 37°C pendant 30 minutes, ajouter une deuxième aliquote de CIP et poursuivre l'incubation pendant 30 minutes encore.

iii) Ajouter 40 µL de H_2O, 10 µL de STE 10X et 5 µL de SDS à 10%. Chauffer à 68°C pendant 15 minutes.

iv) Extraire deux fois au phénol-chloroforme (1:1) et deux fois au chloroforme-alcool isoamylique (24:1).

v) Précipiter l'ADN en ajoutant 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol absolu froid.

vi) Centrifuger à 12 000 tr/min pendant au moins 10 minutes pour sédimenter l'ADN, et jeter le surnageant. Laver le culot d'ADN avec de l'éthanol à 70%, recentrifuger et remettre le culot en suspension dans un tampon TE de façon à obtenir une concentration finale de 0,5 µg/µL.

4.3.3 Dépannage

Problème	Causes possibles	Solution
pas de coupure de l'ADN vecteur	a) présence d'inhibiteurs ou d'impuretés dans la solution d'ADN	a) i) extraire à nouveau la solution avec du phénol, puis avec le mélange chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Précipiter l'ADN avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol. Remettre en suspension dans un tampon TE et couper à nouveau ii) précipiter l'ADN à l'aide de spermidine (voir l'Annexe I-D)
	b) quantité insuffisante d'enzyme	b) faire des essais pilotes pour déterminer la quantité d'unités enzymatiques requise
dégradation de l'ADN vecteur	a) solutions contaminées	a) i) préparer des tampons frais en utilisant de l'eau fraîchement distillée, puis passer à l'autoclave ii) travailler dans des conditions stériles
	b) l'ADN vecteur est contaminé par des exonucléases	b) se procurer de l'ADN vecteur purifié et exempt d'exonucléase

5. IMPORTANCE DE LA SOUCHE DE CELLULE HÔTE DANS LE CLONAGE D'UN ADN GÉNOMIQUE VÉGÉTAL

L'ADN génomique végétal renferme des quantités appréciables de 5-méthylcytosine. Plus de 25% des résidus de cytosine (C) sont méthylés (Shapiro, 1976) chez les plantes, alors que seulement 2 à 7% environ le sont chez les cellules animales (Razin et Riggs, 1980). Chez les plantes, la méthylation se produit au niveau des paires cytosine-guanine (C-G), cytosine-thymine (C-T), cytosine-cytosine (C-C) et cytosine-adénine (C-A). En outre, les séquences trinucléotidiques C-A-G et C-T-G renferment une quantité appréciable de cytosine méthylée, comme le montre l'Annexe IV (Greunbaum et collab., 1981).

Pour qu'une banque d'ADN génomique végétal soit représentative, il faut cloner tous les fragments d'ADN avec la même efficacité. Toutefois, plusieurs souches d'*E. coli* utilisées habituellement comme hôtes pour la création des banques génomiques au moyen de bactériophages comme vecteurs, renferment des gènes qui codent pour des enzymes qui empêchent la coupure de l'ADN double brin au niveau des bases méthylées. Cette restriction cause la mort des phages portant l'ADN méthylé. Les loci géniques associés à ces enzymes sont désignés McrA, McrB et Mrr (Raleigh et collab., 1988).

Les loci géniques Mcr (restriction de cytosine modifée) chez l'hôte *E. coli* influencent le clonage de l'ADN génomique végétal fortement méthylé de la façon suivante :

1) Les souches d'*E. coli* renfermant des loci Mcr ne sont pas transfectées efficacement, car les recombinants renfermant des séquences méthylées ne se multiplient pas. Lorsque l'on veut créer une banque génomique végétale, par exemple chez l'épinette noire, il faut 3 millions de recombinants pour représenter le génome. Les transfections inefficaces sont donc coûteuses.
2) Les séquences d'ADN génomique renfermant de la cytosine méthylée seront sous-représentées.
3) L'ADN des chloroplastes et des mitochondries n'est pas méthylé chez de nombreuses plantes (Tewari et Wildman, 1966; Bonen et collab., 1980); il y aura donc davantage de recombinants renfermant des inserts provenant des chloroplastes et des mitochondries dans les banques génomiques obtenues à partir des souches d'*E. coli* habituellement utilisées.

Pour éviter la mauvaise représentation des séquences renfermant des cytosines méthylées dans la création d'une banque génomique, il faut utiliser une souche hôte d'*E. coli* dépourvue de loci géniques Mcr fonctionnels. On trouve une liste détaillée des phénotypes Mcr d'un certain nombre de souches d'*E. coli* dans l'article d'E.A. Raleigh et collab. (1988).

Dans notre laboratoire, nous avons utilisé la souche d'*E. coli* WA802 (McrA$^-$ et McrB-) pour créer une banque génomique chez *Pinus banksiana* comprenant huit millions de recombinants. Cette souche est un don de D.A. Johnston, du département de biologie de l'Université d'Ottawa.

6. LIGATION, ENCAPSIDATION ET TITRAGE

Il faut déterminer le ratio entre les bras et les inserts possibles dans la préparation d'une réaction de ligation. On peut calculer théoriquement des valeurs optimales pour chaque paramètre (Maniatis et collab., 1982). Toutefois, une certaine proportion des extrémités des molécules sont endommagées, de sorte que les valeurs réelles correspondent rarement aux valeurs théoriques. Il faut donc réaliser des essais pilotes de ligation pour vérifier l'efficacité de la ligation. L'approche la plus simple consiste à vérifier indépendamment chaque variable dans une série d'essais de ligation.

La ligation des extrémités cohésives de l'ADN EMBL3 digéré par BamHI s'effectue à une température qui varie entre 10 et 16°C. Les liaisons d'hydrogènes entre les extrémités cohésives des fragments d'ADN soumis à la ligation sont plus stables à basse température (Dugaiczyk et collab., 1975). La concentration d'ATP dans la réaction de ligation est également critique. La ligation des extrémités franches est complètement inhibée à une concentration finale d'ATP de 5 mM. Cependant, la ligation des extrémités cohésives n'est inhibée qu'en présence d'une concentration finale d'ATP de 180 mM (Ferretti et Sgaramelle, 1981). La concentration d'ATP optimale à la fois pour la ligation des extrémités franches et des extrémités cohésives est de 0,5 à 1 mM.

6.1.1 Détermination des conditions optimales de ligation

i) Au cours de toutes les étapes des tests, il faut maintenir constantes toutes les variables, comme la concentration de la ligase, les tampons, les extraits d'encapsidation et les souches hôtes. Préhybrider les extrémités cohésives en incubant le fragment d'ADN vecteur à 42°C pendant une heure en présence de 10 mM $MgCl_2$ avant la ligation.

ii) Mettre en présence des quantités variables d'ADN vecteur et une quantité constante d'ADN donneur (0,5 µg) selon des ratios de 1:1, 2:1 et 3:1. L'efficacité maximale devrait être obtenue pour des rapports molaires de bras d'ADN vecteur hybridé et de fragments d'ADN donneur à peu près égaux. Les fragments d'ADN vecteur ayant 30 kb et l'ADN donneur mesurant en moyenne 20 kb, le rapport molaire doit être de 3:2.

iii) Diviser le mélange d'encapsidation en cinq portions égales et ajouter à chacune 1/5 du volume total du mélange de ligation. Procéder à l'encapsidation selon les instructions du fabricant et titrer.

iv) Le volume de la réaction de ligation doit être gardé à 5-10 µL pour une meilleure efficacité de la ligation et de l'encapsidation. À remarquer que l'on peut améliorer l'efficacité de l'encapsidation en extrayant l'ADN obtenu après ligation au phénol, en le précipitant à l'éthanol et en le remettant en suspension dans 5-10 µL de tampon TE avant de procéder à l'encapsidation dans 50 µL d'extrait d'encapsidation.

6.1.2 Dépannage

Problème	Causes possibles	Solution
pas de ligation entre donneur et l'ADN vecteur	a) la solution d'ADN donneur renferme des inhibiteurs	a) purifier l'ADN (voir l'Annexe I)
	b) le tampon de la ligase est défectueux	b) remplacer le tampon
	c) ligase T4 inactive	c) remplacer la ligase
	d) dégradation de l'ADN vecteur ou de l'ADN donneur	d) soumettre l'ADN à l'électrophorèse en gel d'agarose pour déterminer si l'ADN est dégradé. Si tel est le cas, isoler à nouveau, purifier et recommencer la ligation
pas d'encapsidation de l'ADN	a) l'ADN vecteur n'est pas hybridé	a) avant la ligation, hybrider l'ADN vecteur en incubant à 42°C pendant une heure en présence de $MgCl_2$ 10 mM
	b) présence d'inhibiteurs	b) i) purifier l'ADN (voir l'Annexe I) ii) isoler l'ADN d'autres tissus ou de tissus à d'autres stades de développement si possible
	c) la ligation n'a pas fonctionné	c) vérifier la ligation par électrophorèse, puis se reporter à la rubrique précédente pour déterminer pourquoi l'ADN donneur ne se lie pas à l'ADN vecteur
	d) les témoins indiquent que l'encapsidation s'est mal effectuée	d) changer de lot ou essayer une autre marque
titres bas	a) la ligation ou l'encapsidation n'a pas fonctionné	a) voir ci-dessus
	b) le phage ne s'est pas adsorbé sur les cellules	b) cultiver les cellules en présence de maltose à 0,2% et de $MgSO_4$ 10 mM
	c) cellules bactériennes hôtes non compétentes	c) i) vérifier la composition du milieu en maltose ii) centrifuger la culture de cellules hôtes jusqu'au lendemain et remettre en suspension dans le $MgSO_4$ 10 mM iii) vérifier les conditions de croissance, la température, le volume du milieu, la taille du récipient d'aération iv) ensemencer en stries un échantillon de la souche hôte conservée dans le glycérol à -80°C. Prélever une seule colonie et cultiver dans bouillon jusqu'au lendemain. v) mettre les cellules en présence des phages pour déterminer qu'elles appartiennent bien à l'espèce voulue

Problème	Causes possibles	Solution
	d) ratio de ligation non optimal	d) essayer d'autre ratios d'ADN vecteur/ADN donneur, tels 1:2, 1:3, 1:4 si la quantité d'ADN n'est pas limitante
plages trop petites	a) concentration de la gélose molle trop élevée	a) préparer de la gélose à 0,6% ou moins
	b) concentration de Mg^{++} trop basse ou trop élevée	b) ajuster la concentration finale de $MgSO_4$ à 10 mM dans la gélose TB et dans la gélose molle

6.2 Mise à l'échelle de la ligation et de l'encapsidation

En utilisant le ratio optimal ADN vecteur/ADN donneur et les paramètres déterminés dans les essais et en tenant compte du bruit de fond, on peut réaliser des réactions multiples de ligation sur une grande échelle. Il est important de maintenir constants les ratios de toutes les solutions dans la mise à l'échelle. À partir des titres obtenus dans les essais de ligation, il est possible de calculer les quantités d'ADN vecteur et d'ADN donneur requises pour obtenir une banque complète.

i) Cultiver une souche hôte permissive (NM538 ou LE392) et une souche hôte restrictive (NM539) en ensemençant une seule colonie de chacune des souches dans 50 mL de bouillon TB dans un flacon de 250 mL additionné de 0,5 mL de maltose à 20% et de 0,5 mL de $MgSO_4$ 1M. Incuber à 30°C avec agitation jusqu'au lendemain. Centrifuger les cellules et remettre en suspension dans 2/5 de volume de $MgSO_4$ 10 mM. Conserver à 4°C jusqu'au moment de l'utiliser.

ii) Réaction de ligation :

*x µg d'ADN EMBL3 dans un tampon TE
*y µg d'ADN donneur
10,0 µL de tampon pour ligase 5X fraîchement préparé (voir annexe II)
10,0 µL d'ADN ligase T4 (10 unités Weiss)
eau pour obtenir 50 µL

*x + y = 5 µg au maximum

Cette réaction peut être mise à l'échelle, mais le volume de réaction ne doit pas dépasser 50 µL, sinon l'efficacité de la réaction est réduite. Réaliser autant de réactions que nécessaire pour obtenir la banque complète.

iii) Incuber le milieu de ligation à 15°C jusqu'au lendemain.

iv) Encapsider 10 µL de milieu de ligation (5 µg d'ADN EMBL3 au maximum) dans un extrait d'encapsidation. Suivre les instructions fournies avec le système d'encapsidation *in vitro* utilisé. On peut augmenter l'efficacité de l'encapsidation en précipitant l'ADN traité à la ligase avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et de l'éthanol absolu froid et en remettant en suspension dans un tampon TE avant l'encapsidation.

7. AMPLIFICATION ET CONSERVATION

Les banques amplifiées peuvent conserver un titre élevé pendant plusieurs années. Elles permettent l'isolement de nombreux gènes au cours d'une période donnée et sont utiles dans les cas où l'accès doit être répété, comme pour le "chromosome walking". Les banques amplifiées sont également pratiques lorsqu'elles doivent être distribuées à d'autres chercheurs. L'amplification présente l'inconvénient que la croissance différentielle des recombinants se reflète dans les séquences de la banque amplifée et que, par conséquent, il faut passer en revue un plus grand nombre de clones pour trouver certaines séquences. En outre, certaines séquences sont surreprésentées ou sous-représentées à cause de la croissance compétitive des recombinants dans un milieu de culture liquide ou d'une densité de plages élevée.

Il se produit une surreprésentation ou une sous-représentation de certaines séquences dans la banque amplifiée lorsque la bactérie hôte (par exemple NM539rec+) est infectée simultanément par plus d'un clone phagique et que des recombinaisons peuvent s'effectuer. On peut minimiser le problème en cultivant la banque primaire de façon à obtenir une densité de plages relativement faible permettant de distinguer les plages individuelles sur les boîtes de gélose. Pour réduire l'hétérogénéité de la taille des plages et ainsi l'amplification différentielle, il faut utiliser des cellules fraîchement cultivées auxquelles les phages ont été préadsorbés, et garder les boîtes à l'horizontale jusqu'à ce que la gélose molle soit bien prise. Il faut prévenir toute condensation sur les boîtes en les retournant pendant l'incubation ou en les séchant dans des conditions stériles avant l'incubation.

Procédé d'amplification et de conservation

i) Titrer le plus exactement possible tous les extraits de phages encapsidés.
ii) Dans une boîte de culture NUNC de 530 cm^2, ensemencer le phage à une concentration de 50-100 X 10^3 pfus/boîte.
iii) Incuber jusqu'à l'apparition de plages nettes, soit pendant 7 à 12 heures. Les plages doivent être bien séparées de façon à éviter les recombinaisons.
iv) Incuber les plages à 4°C pendant 1 heure, ajouter 35 mL de tampon SM et incuber à 4°C en position horizontale jusqu'au lendemain.
v) Recueillir le tampon, ajouter du chloroforme, agiter doucement et centrifuger les débris.
vi) Mettre le lysat dans un tube propre et conserver à 4°C sur chloroforme. Se conserve indéfiniment.

8. ÉVALUATION DE LA QUALITÉ D'UNE BANQUE D'ADN GÉNOMIQUE

L'un des éléments les plus importants de la qualité d'une banque d'ADN génomique est la possibilité d'isoler facilement un gène cloné de cette banque. Après l'amplification, il faut évaluer le nombre de séquences qui se trouvent dans la banque et déterminer si des réarrangements importants sont intervenus au cours de la construction et de l'amplification. Phillips et collab. (1985) ont mis au point une méthode empirique pour déterminer si une banque génomique lambda peut être une bonne source de clones portant certaines séquences. Une analyse comparative par hybridation de transfert montre qu'une banque constitue une bonne source de clones lorsqu'on trouve des bandes correspondantes dans l'ADN de la banque et l'ADN génomique digérés par le même enzyme de restriction. L'absence d'une bande dans la banque indique que la séquence d'intérêt n'est pas présente dans la banque. La présence d'une bande unique dans la banque, ne correspondant pas à une bande de l'ADN génomique digéré, indique que l'ADN génomique a probablement subi certains réarrangements au cours de la création de la banque. On consultera Phillipps et collab. (1985) pour obtenir de plus amples détails sur cette méthode d'évaluation.

9. CONCLUSION

La création d'une banque d'ADN génomique permet d'avoir accès à un ensemble de gènes et à leurs séquences, et ainsi d'étudier la structure nucléotidique, la régulation et l'expression de ces gènes. Dans le présent guide, nous avons décrit la création d'une banque d'ADN génomique pour l'épinette noire à l'aide du vecteur phagique EMBL3. L'ADN des conifères est plus difficile à isoler, à purifier et à cloner que l'ADN d'autres sources, comme celui des bactéries ou des tissus animaux, notamment à cause des facteurs tels la teneur en protéines et en polysaccharides du matériel de départ (aiguilles ou semis) et le degré de méthylation ou la stéréochimie de la molécule d'ADN. On a créé une banque d'ADN génomique pour le pin lodgepole à partir de semis à l'aide du vecteur EMBL3 et des extraits Packagene (Promega) (résultats non publiés; Byrne et collab.). Toutefois, l'encapsidation au moyen des extraits Packagene a été inhibée lors de la ligation de l'ADN vecteur EMBL3 à l'ADN génomique de l'épinette noire isolé à partir d'aiguilles mûres ou de semis. Nous avons résolu ce problème en liant l'ADN du vecteur EMBL3 à l'ADN génomique de l'épinette noire isolé à partir d'une culture de cellules en suspension; l'encapsidation a été faite à l'aide des extraits GigaPak Gold (Bio-Mega).

Les gènes ubiquistes ayant fortement tendance à être conservés, isolés d'autres espèces, peuvent servir de sondes pour vérifier la présence de séquences apparen-

tées dans les banques. En comparant les données sur la séquence des nucléotides dans les gènes de différentes espèces, on peut mieux comprendre la biologie moléculaire de ces espèces, les mécanismes régissant l'évolution et les relations entre les espèces. Une banque permanente de clones, comprenant des séquences se recoupantes, facilite l'isolement des nombreux gènes liés qui constituent un locus génique complexe et ceux qui s'expriment de façon coordonnée ou séquentielle. De plus amples recherches devraient révéler des relations éventuelles entre certains événements cellulaires et l'expression des gènes. En étudiant les effets des facteurs externes, comme les maladies, l'état nutritionnel, le stress environnemental et les modifications dues à la croissance sur l'expression des gènes, on pourra comprendre davantage les mécanismes moléculaires fondamentaux qui interviennent chez les arbres.

Références

Berger, S.L., Kimmel, A.R. 1987. Guide to molecular cloning techniques. Methods in Enzymology Vol. 152. Academic Press, Inc.

Bonen, L., Huh, T.Y., Gray, M.W. 1980. Can partial methylation explain the complex fragment patterns observed when plant mitochondrial DNA is cleaved with restriction endonucleases. FEBS Letters 111: 340-346.

Blumenthal, R.M. 1986. *E. coli* can restrict methylated DNA and may skew genomic libraires. Trends Biotechnol. 4: 302-305.

Clarke, L., Carbon, J. 1976. A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. Cell 9: 91-99.

Davis, R.W., Botstein, D., Roth, J.R. 1980. Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Box 100. Cold Spring Harbor, NY.

Dugaiczyk, A., Boyer, H.W., Goodman, H.M. 1975. Ligation of *Eco*RI endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures. J. Mol. Biol. 96: 171-184.

Ferretti, L., Sgaramelle, V. 1981. Specific and reversible inhibition of the blunt end joining activity of the T4 DNA ligase. Nucleic Acids Res. 9: 3695-3705.

Frischauf, A-M., Lehrach, H., Poustka, A., Murray, N. 1983. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. J. Mol. Biol. 170: 827-842.

Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H., Razin, A. 1981. Sequence specificity of methylation of higher plant DNA. Nature 292: 860-862.

Kaiser, K., Murray, N.E. 1985. The use of phage lambda replacement vectors in the construction of representative genomic DNA libraries. Pages 1-47 *in* Glover, D.M. (édit.), DNA cloning: a practical approach. IRL Press, Oxford.

Karn, J.M., Brenner, S., Barnett, L., Cesareni, G. 1980. Novel bacteriophage lambda cloning vector. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77: 5172-5176.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Box 100, Cold Spring Harbor, NY.

Mettler, I.J. 1987. A simple and rapid method for minipreparation of DNA from tissue cultured plant cells. Plant Mol. Biol. Reporter 5: 346-349.

Miksche, J.P., Dhillon. 1981. Nucleic acid research techniques in forest genetics. Pages 329-371 *in* Advances in Forest Genetics (Inde).

Murray, M.G., Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.

Phillips, S.L., Cassavant, N.C., Hutchison, C.A.,III, Marshall, H.E. 1985. An empirical method for the evaluation of the quality of genomic DNA libraries. Nucleic Acids Res. 13: 2699-2708.

Raleigh, E.A., Murray, N.E., Revel, H., Blumenthal, R.M., Westaway, D., Reith, A.D., Rigby, P.W.J., Elhai, J., Hanahan, D. 1988. McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. Nucleic Acids Res. 16: 1563-1575.

Razin, A., Riggs, A.D. 1980. DNA methylation and gene function. Science 210: 604-610.

Rogers, S.O., Bendich, A.J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium, and mummified plant tissues. Plant Mol. Biol. 5: 69-76.

Shapiro, H.S. 1976. CRC Handbook: Biochemistry and Molecular Biology. 2: 259.

Tewari, K.K., Wildman, S.G. 1966. Chloroplast DNA from tobacco leaves. Science 153: 1269-1271.

Walker, J.M. (édit.) 1984. Methods in Molecular Biology 2: Nucleic Acids. Humana Press, Clifton, NJ.

Remerciements

Les auteurs désirent remercier F.M. Tremblay, P. Périnet et J. Lavereau qui ont fourni les suspensions de cellules de conifères, D.A. Johnson qui a gracieusement fourni la souche WA802 et E.A. Raleigh qui a gracieusement fourni les souches ER1647 et ER1648. Les auteurs sont également reconnaissants à V.L. Seligy et à L. Bonen qui ont accepté de réviser ce guide.

Annexe I: Méthodes de purification de l'ADN

A. Méthode ELUTIP-d (d'après les instructions générales de Schleicher et Schuell)

1. Pour éluer les fragments de 20 kb du gel d'agarose, prélever la bande voulue et la mettre dans une seringue de 20 mL.
2. En se servant du piston de la seringue, expulser l'agarose à travers une aiguille de calibre 18 dans un tube à bouchon à vis stérile. Ajouter 10 mL de tampon d'élution à faible teneur en sel (ou 3 fois le volume d'agarose). Passer au vortex.
3. Agiter à 37°C jusqu'au lendemain. L'ADN est maintenant dans le tampon.
4. Placer un filtre GF/C au fond d'une seringue de 20 mL. Verser dans la seringue le tampon contenant les morceaux de gel. Laisser le tampon s'écouler à travers le filtre dans un tube propre sans exercer de pression.
5. Utiliser le piston pour chasser doucement le liquide qui reste au-dessus de l'agarose dans la seringue et recueillir le tampon dans un microtube à centrifuger. Ajouter ce tampon à celui qui a été obtenu à l'étape 4.

Préparation de la colonne :

1. Charger une seringue de 5 mL avec 1-2 mL de solution à teneur élevée en sel.
2. Couper le bout d'une colonne ELUTIP-d. Enlever le bouchon protecteur supérieur et fixer à la seringue.
3. Prélaver la matrice en forçant la solution à teneur élevée en sel à travers la colonne. Attention: la solution ne peut circuler que dans un sens dans les colonnes ELUTIP-d.
4. Pour amorcer la colonne, charger une deuxième seringue avec 5 mL de solution à faible teneur en sel.
5. Débrancher la colonne fixée à la première seringue et fixer à la deuxième seringue contenant la solution à faible teneur en sel. Amorcer la colonne avec la solution à faible teneur en sel pour chasser toute la solution à teneur élevée en sel de la colonne.

Liaison et élution de l'ADN :

1. Débrancher la colonne de la seringue et charger celle-ci avec l'échantillon d'ADN.
2. Fixer un préfiltre jetable en acétate de cellulose de 0,45 µm à la seringue. Le préfiltre retient les particules de l'échantillon.
3. Fixer à nouveau la colonne au support du filtre jetable, puis faire passer tout l'échantillon à travers le filtre et la colonne. L'ADN s'adsorbe à la matrice de la colonne. Il faut maintenir un faible débit, de l'ordre de 1-2 mL/minute, pour que tout l'ADN s'adsorbe à la matrice.
4. Débrancher momentanément la colonne et le filtre de la seringue (ne rien jeter) et charger cette dernière avec 2-3 mL de solution à faible teneur en sel. Rebrancher la colonne et le filtre à la seringue et laver les traces d'échantillon d'ADN qui pourraient rester dans la seringue et le filtre.
5. Débrancher le filtre et la colonne de la seringue et jeter le préfiltre.
6. Pour éluer l'ADN, charger la seringue avec 0,4 mL de solution à teneur élevée en sel et fixer à nouveau la colonne à la seringue. Éluer l'ADN avec la solution à teneur élevée en sel dans un microtube à centrifuger de 1,5 mL. On peut, au besoin, concentrer davantage l'ADN en le précipitant à l'alcool. Dissoudre l'ADN dans un tampon TE.

Les fragments d'ADN sont maintenant sous une forme concentrée et purifiée et peuvent être utilisés dans d'autres manipulations.

B. Purification sur gradient de sucrose

La centrifugation des fragments d'ADN donneur sur gradient de sucrose produit un ADN d'une pureté inégalée pour le clonage, avec absence d'inhibiteurs de la ligation ou de l'encapsidation.

1. Préparer deux gradients de 38 mL de sucrose (10-40% p/v) dans des tubes à ultracentrifugation à l'aide des produits commerciaux à cet effet. Les solutions de sucrose sont préparées dans un tampon Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), renfermant 1 M de NaCl et 5 mM d'EDTA.
2. Placer sur chaque gradient de 250 à 500 µg d'ADN donneur partiellement digéré dans un volume maximum de 500 µL de tampon TE. La surcharge du gradient peut donner une piètre séparation des fragments. Centrifuger les échantillons à 26 000 tr/min pendant 24 heures à 15°C.
3. Perforer le fond du tube à l'aide d'une aiguille de calibre 21 et recueillir des fractions de 0,5 mL.
4. Prendre des aliquotes à toutes les trois fractions et analyser par électrophorèse en gel d'agarose à 0,4% en incluant les marqueurs de taille appropriés. Photographier le gel. Indentifer les fractions renfermant les fragments de la taille voulue et les réunir.

5. Dialyser les fractions réunies contre 4 litres de tampon TE à 4°C pendant 16 à 24 heures, en changeant le tampon 2 ou 3 fois.
6. Procéder à la purification sur colonne NACS.

C. Purification sur colonne NACS (d'après le guide d'utilisation du Prepac NACS de BRL)

La résine NACS est une résine échangeuse d'ions qui retient quantitativement les acides nucléiques en présence d'une faible teneur en sel (NaCl 0,1-0,5 M) et les relâche quantitativement en présence d'une teneur élevée en sel (NaCl 0,7-2,0 M). Chaque nécessaire Prepac renferme suffisamment de résine NACS-52 pour lier jusqu'à 40 µg de matériel A. La liaison et la récupération des acides nucléiques est optimale sur Prepac NACS lorsque l'échantillon ne renferme pas de solvants organiques (chloroforme, éthanol, éther, phénol), de détergents (SDS, Triton, sarcosyl), de protéines (BSA, enzymes), de métaux lourds ou de cations polyvalents (polylysine, spermine). En général, la liaison et la récupération des acides nucléiques sont optimales lorsque ces derniers ont d'abord été extraits au phénol et précipités à l'éthanol avant d'être chromatographiés sur Prepac NACS.

Méthode de chromatographie sur minicolonne Prepac NACS :

1. Laver la résine 3 fois avec du tampon TE renfermant 2,0 M de NaCl. La meilleure façon d'effectuer cette hydratation consiste à fixer la colonne Prepac au barillet d'un Pipetman de 1 mL, d'aspirer la solution par le bas de la colonne jusque dans le réservoir, puis de chasser la solution en enfonçant le piston. Le liquide peut circuler dans les deux sens dans la colonne de NACS au moment de l'hydratation.
2. Laver la résine avec du tampon C. Utiliser la technique décrite à l'étape 1 ci-dessus.
3. A partir de ce moment, il est habituellement plus pratique d'enlever le Pipetman et de fixer la colonne Prepac sur un support circulaire. On dépose l'échantillon d'ADN (dissout dans un tampon C) en haut de la colonne et on laisse éluer par gravité de façon à favoriser la liaison au maximum. On peut fixer le réservoir de la colonne sur la minicolonne pour augmenter le volume au-dessus du gel à 6 mL.
4. Ajouter 3 à 5 mL de tampon C sur la colonne et laisser pénétrer par gravité ou augmenter le début à l'aide du Pipetman.
5. Éluer 3 fois la minicolonne par gravité avec 100 à 200 µL de tampon D. Expulser les traces de tampon à l'aide d'un Pipetman.
6. Ajouter 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol froid pour précipiter l'ADN. Laver avec de l'éthanol à 70%. Remettre en suspension dans un tampon TE.

D. Précipitation de l'ADN à la spermidine

1. Ajuster la solution d'ADN à une concentration de 100 µg/mL ou moins avec du tampon TE.
2. Ajouter du KCl jusqu'à une concentration finale de 100 mM et de la spermidine jusqu'à une concentration finale de 10 mM.
3. Incuber sur glace pendant 30 minutes.
4. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 10 minutes. Jeter la phase aqueuse.
5. Laver le culot avec une solution renfermant de l'éthanol à 75%, de l'acétate de sodium 300 mM et de l'acétate de magnésium 10 mM. Agiter brièvement sur un vortex toutes les 15 minutes pendant 1 à 4 heures.
6. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 10 minutes. Jeter la phase aqueuse.
7. Laver le culot avec de l'éthanol à 70% pendant 30 minutes sur glace.
8. Centrifuger à 10 000 tr/min pendant 5 minutes. Sécher brièvement.
9. Remettre le culot en suspension dans un tampon TE.

Annexe II. Composition des milieux de culture et des tampons

Bouillon L	tryptone	10 g
	extrait de levure	5 g
	NaCl	10 g
	eau q.s. pour	1 L

Ajuster le pH à 7,2. Ajouter du $MgSO_4$ jusqu'à 10 mM et 10 mL de maltose à 20% par litre pour la croissance du phage lambda et de ses dérivés

Gélose nutritive L	Bouillon L additionné de gélose, sans maltose	15 g
Gélose nutritive L molle	Bouillon L additionné de gélose, sans maltose (ou d'agarose)	6 g
Bouillon TB	tryptone	10 g
	NaCl	5 g
	eau q.s. pour	1 L

Autoclaver et ajouter 10 mL de $MgSO_4$ 1 M et 10 mL de maltose à 20%.

Gélose nutritive TB	Bouillon TB additionné de gélose, sans maltose	15 g
Gélose nutritive TB molle	Bouillon TB additionné de gélose, sans maltose (ou d'agarose)	6 g
Tampon d'extraction CTAB (bromure de cétyltriméthylammonium)	Tri-HCl (pH 8,0)	50 mM
	EDTA	5 mM
	Sorbitol	0,35 mM
	BSA (Sigma A4503)	0,1%
	PEG 4000	10%
	Spermine	0,1%
	Spermidine	0,1%
	Au moment d'utiliser, ajouter	
	β-mercaptoéthanol	0,1%
Tampon de lavage CTAB	Tri-CHl (pH 8,0)	50 mM
	EDTA	25 mM
	Sorbitol	0,35 M
	Au moment d'utiliser, ajouter	
	β-mercaptoéthanol	0,1%
Tampon d'homogénéisation de Mettler	sarcosyl	1%
	sucrose	0,25 M
	NaCl	50 mM
	EDTA	20 mM
	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
Tampon *Sau*3 10X	Tris-HCl (pH 7,4)	20 mM
	$MgCl_2$	5 mM
	KCl	50 mM
Tampon *Mbo*I 10X	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	$MgCl_2$	10 mM
	NaCl	50 mM

Tampon TAE 50X	Tris base (pH 8,0)	242 g
	acide acétique glacial	57 mL
	EDTA (0,25 M)	200 mL
Gel d'électrophorèse	tampon TAE 1X	100 mL
	*agarose	0,4%
	bromure d'éthidium (10 mg/mL)	4 µL
	*ou concentration requise	
Tampon CIP 10X	Tris-HCl (pH 9,0)	0,5 M
	$MgCl_2$	10 mM
	ZnCl	1 mM
	spermidine	10 mM
STE 10X	Tris-HCl (pH 8,0)	100 mM
	NaCl	1 M
	EDTA	10 mM
Tampon pour ligase 5X	Tris-HCl (pH 7,8)	250 mM
	$MgCl_2$	50 mM
	DTT	100 mM
	ATP	5 mM
	BSA	250 µg/uL

Utiliser du tampon de ligase frais. Les gels et dégels répétés diminuent l'efficacité de la ligation et par conséquent le titre de l'encapsidation.

Diluant lambda	Trip-HCl (pH 7,5)	10 mM
	$MgCl_2$	10 mM
	EDTA	0,1 mM
Tampon de dilution du phage (tampon SM ou SMC)	Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM
	NaCl	100 mM
	$MgSO_4$	10 mM
	gélatine	0,2%
Tampon TE	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
Tampon à faible teneur en sel	NaCl	0,2 M
	Tris-HCl (pH 7,4)	20 mM
	EDTA	1 mM
Tampon à teneur élevée en sel	NaCl	1 mM
	Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
	EDTA	1 mM
Tampon C	NaCl	0,5 M
	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	1 mM
Tampon D	NaCl	2 M
	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	1 mM

Souches hôtes	WA802 (mcrA$^-$ et mcrB$^-$) LE392 pour l'ADN lambda témoin ER1647 ER1648
ADN témoin	lambda cI857 *Sam*7 lié

Annexe III:

Tableau 1. Nombre de recombinants requis pour représenter le génome de diverses espèces

Espèce	Quantité d'ADN (pg/noyau)	Quantité d'ADN (pb/génome haploïde)	Nombre de recombinants pour une banque représentative
Juniperus virginiana	19,3*	$9,75 \times 10^9$	$2,61 \times 10^6$
Larix laricina	19,0*	$9,5 \times 10^9$	$2,57 \times 10^6$
Picea abies	29,6*	$14,8 \times 10^9$	$4,00 \times 10^6$
Picea glauca	17,0*	$8,5 \times 10^9$	$2,30 \times 10^6$
Picea mariana	22,2*	$11,1 \times 10^9$	$3,00 \times 10^6$
Pinus banksiana	29,8*	$14,9 \times 10^9$	$4,04 \times 10^6$
Pinus contorta	24,4*	$12,2 \times 10^9$	$3,30 \times 10^6$
Pinus lambertiana	35,2*	$17,6 \times 10^9$	$4,77 \times 10^6$
Pinus radiata	22,3*	$11,2 \times 10^9$	$3,03 \times 10^6$
Pinus resinosa	41,0*	$20,5 \times 10^9$	$5,55 \times 10^6$
Pinus rigida	17,8*	$8,9 \times 10^9$	$2,41 \times 10^6$
Pinus strobus	38,8*	$19,4 \times 10^9$	$5,26 \times 10^6$
Pinus sylvestris	27,6*	$13,8 \times 10^9$	$3,74 \times 10^6$
Thuja occidentalis	12,6*	$6,3 \times 10^9$	$1,71 \times 10^6$
Tsuga canadensis	27,0*	$13,5 \times 10^9$	$3,66 \times 10^6$
Nicotiana tabacum (NT-1)**	7,8	$3,9 \times 10^9$	$1,06 \times 10^5$
*Arabidopsis thaliana***	0,16	$8,0 \times 10^7$	$2,17 \times 10^4$
Humain***	6,6	$3,3 \times 10^9$	$7,60 \times 10^5$
*Escherichia coli****	0,0084	$4,2 \times 10^6$	$9,20 \times 10^2$

* Miksche et Dhillon, 1981.
** Rogers et Bendich, 1985.
*** Kaiser et Murray, 1985.

Annexe IV:

Tableau 2. Concentration de 5-méthylcytosine dans l'ADN végétal (Gruenbaum et collab., 1981)

Séquence d'ADN	% de méthylation
C-G	82
C-A	19
C-T	19
C-C	7
C-A-G	>80
C-T-G	>80
C-A-T	<4